

エヴァテック株式会社 殿

# 報 告 書

－件名－

次亜塩素酸（エヴァ水）の殺菌能力試験

表題の件に関して、ご報告致します。

NO101004

平成 22 年 10 月 6 日

北里大学

大学院 感染制御科学府

北里大学北里生命科学研究所

細菌感染制御学研究室

医学博士 桑江 朝臣

〒108-8641

東京都白金台 5-9-1

## 実験方法

### 1 日目

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 (O157)

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (サルモネラ, ネズミチフス菌)

*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)

上記 3 菌種を凍結保存から 3 ml の LB 液体培地に植菌し、37°C で 20 時間振盪培養した。

### 2 日目

各菌の培養液の OD<sub>600</sub> を測定後、 $1 \times 10^6$  CFU/ml となることを期待して滅菌純水で適宜希釈し、菌懸濁液を調製した。

4 本のチューブを用意し、各チューブに以下の溶液を調製した。

Tube1: 2 ml エヴァア水

Tube2: 2 ml エヴァア水 + 20 $\mu$ l 50 mg/ml L-アスコルビン酸(MW: 176.12)

Tube3: 2 ml 滅菌純水 + 20 $\mu$ l 50 mg/ml L-アスコルビン酸

Tube4: 2 ml 滅菌純水

(Tube1 は試験対象, Tube2 はアスコルビン酸が本当に働いているかのコントロール, Tube3 はアスコルビン酸による増殖阻害活性測定, Tube4 は生菌数の測定)

各チューブに 100  $\mu$ l の菌懸濁液を添加し、ヴォルテックスで攪拌した後に 30 秒間室温にて静置し、その後 10 倍希釈液、100 倍希釈液を調製した。Tube1~3 については 0.5 mg/ml の L-アスコルビン酸を含む滅菌純水を、Tube4 については滅菌純水を希釈に用いた。

## アスコルビン酸について=====

L-アスコルビン酸の濃度に関しては以下の記述を参考にした。

<http://www.saitama-u.ac.jp/ashida/ques-box/quesbox206.htm>

記述に従うと 50 ppm の次亜塩素酸の不活化には 171 mg/l の濃度が必要であることから、本試験では 500 mg/l の濃度を使用した。また、アスコルビン酸の 50 mg/ml の溶液は当日の試験直前に純水を用いて調製し、フィルター滅菌したものを用いた。

=====

10 倍希釈液を 50  $\mu$ l, 100 倍希釈液を 100  $\mu$ l, LB プレートにまき、37°C で一晩インキュベートした。

3 日目

各プレートに出現したコロニー数を計測した。

## 実験結果

各菌の LB 液体培地で培養後の OD<sub>600</sub> の値は以下の通りであった。

O157: 4.1

サルモネラ: 2.8

緑膿菌: 3.2

コロニー数は以下のとおり

O157

	1. エヴァ水	2. エヴァ+ア	3. 水+ア	4. 水
10 希釈 (50 ml)	0	82	80	93
100 希釈 (100 ml)	0	15	22	27

サルモネラ

	1. エヴァ水	2. エヴァ+ア	3. 水+ア	4. 水
10 希釈 (50 ml)	0	280	320	310
100 希釈 (100 ml)	0	52	55	57

緑膿菌

	1. エヴァ水	2. エヴァ+ア	3. 水+ア	4. 水
10 希釈 (50 ml)	0	45	0	173
100 希釈 (100 ml)	0	0	0	48

結果より、 $1 \times 10^6$  CFU/ml となることを期待して調製した菌懸濁液の実際の濃度はおおよそ以下の通りであった。

O157 :  $4 \times 10^5$  CFU/ml

サルモネラ :  $1.3 \times 10^6$  CFU/ml

緑膿菌 :  $8.3 \times 10^5$  CFU/ml

本試験の条件でエヴァ水により 0157 は少なくとも 98%以上、サルモネラは少なくとも 99.6%以上、殺菌されることが示された。

緑膿菌の Tube3（水+アスコルビン酸）のプレートにコロニーが認められず、Tube4（水のみ）のプレートにはコロニーが認められたことから、アスコルビン酸が緑膿菌の増殖を阻害している可能性が極めて高い。緑膿菌の Tube1 のプレートにコロニーが出現しなかった理由がエヴァ水による殺菌効果かアスコルビン酸による増殖阻害効果であるか結論を出すことができなかった。

以上

# 殺菌試験結果(写真)

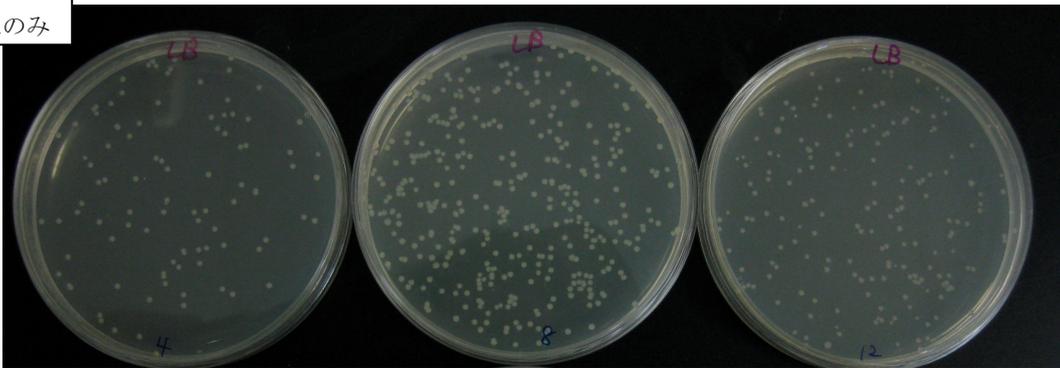
滅菌水 30 秒後とエヴァ水 30 秒後

O-157

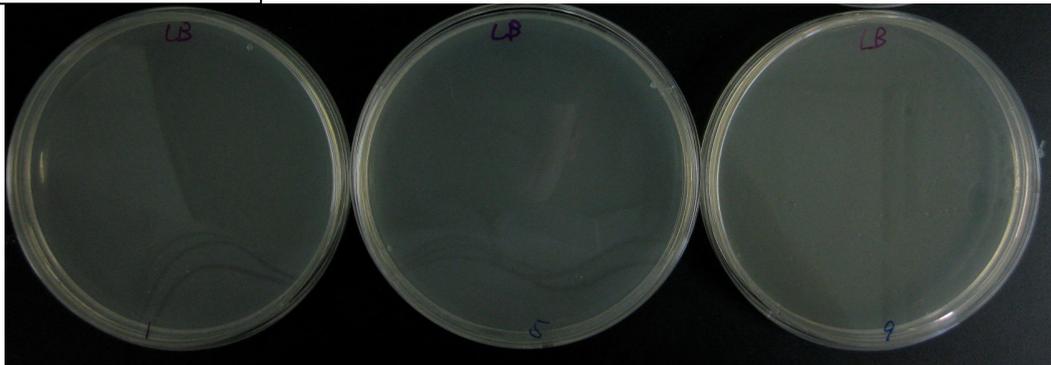
サルモネラ

緑膿菌

滅菌水のみ



50ppm エヴァ水 30 秒間



## 101006 報告書

### 実験方法

1 日目 (10 月 4 日)

*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)

上記 1 菌種を凍結保存から 3 ml の LB 液体培地に植菌し、37°C で 20 時間振盪培養した。

2 日目

培養液の OD<sub>600</sub> を測定後、 $1 \times 10^6$  CFU/ml となることを期待して滅菌純水で適宜希釈し、菌懸濁液を調製した。

4 本のチューブを用意し、各チューブに以下の溶液を調製した。

Tube1: 2 ml エヴァア水 50 ppm

Tube2: 2 ml エヴァア水+20 $\mu$ l 10 mg/ml チオ硫酸ナトリウム

Tube3: 2 ml 滅菌純水+20 $\mu$ l 10 mg/ml チオ硫酸ナトリウム

Tube4: 2 ml 滅菌純水

各チューブに 100  $\mu$ l の菌懸濁液を添加し、ヴォルテックスで攪拌した後に 30 秒間室温にて静置し、その後 10 倍希釈液を調製した。Tube1〜3 については 0.1 mg/ml の 10 mg/ml チオ硫酸ナトリウムを含む滅菌純水を、Tube4 については滅菌純水を希釈に用いた。

10 倍希釈液を 50  $\mu$ l, LB プレートにまいた。

さらに 4 本のチューブを用意し、各チューブに以下の溶液を調製した。(30 秒静置後に直ちに希釈する操作を行えるチューブの数は 4 本が限界のため、実験を 2 回に分けた。)

Tube5: 2 ml エヴァア水 50 ppm

Tube6: 2 ml エヴァア水 5 ppm

Tube7: 2 ml エヴァア水 0.5 ppm

Tube8: 2 ml 滅菌純水

各チューブに 100  $\mu$ l の菌懸濁液を添加し、ヴォルテックスで攪拌した後に 30 秒間室温にて静置し、その後 10 倍希釈液を調製した。希釈は 10 mg/ml チオ硫酸ナトリウムを含む滅菌純水を用いた。

10 倍希釈液を 50  $\mu$ l, LB プレートにまいた。

37°C で一晩インキュベートした。

3 日目

各プレートに出現したコロニー数を計測した。

## 実験結果

LB 液体培地で培養後の OD<sub>600</sub> の値は 4.65 であった。

コロニー数は以下のとおり

Tube1 (エヴァ水 50 ppm) : 0

Tube2 (エヴァ水 50 ppm + チオ硫酸ナトリウム) : 369

Tube3 (滅菌水 + チオ硫酸ナトリウム) : 365

Tube4 (滅菌水) : 372

Tube5 (エヴァ水 50 ppm) : 0

Tube6 (エヴァ水 5 ppm) : 0

Tube7 (エヴァ水 0.5 ppm) : 0

Tube8 (滅菌水) : 402

結果より、 $1 \times 10^6$  CFU/ml となることを期待して調製した菌懸濁液の実際の濃度はおおよそ  $1.6 \times 10^6$  CFU/ml であった。

50 ppm, 5 ppm, および 0.5 ppm のエヴァ水との 30 秒間の接触により緑膿菌は 99.7%以上、殺菌されることが示された。

以上

## 緑膿菌 殺菌試験結果(写真)

エヴァ水

---

50ppm

5ppm

0.5ppm

滅菌水

